Français

FIDIS™ Rheuma - RF

REF **MX 103** 96

DEFINITION

Le coffret **FIDIS™ Rheuma - RF** (Theradiag) constitue une méthode d'identification quantitative d'autoanticorps sur supports particulaires utilisant un système de détection par cytométrie de flux. Il permet la recherche simultanée des facteurs rhumatoïdes des classes IgM dirigés contre les déterminants Fc d'Immunoglobulines G, humaines ou animales.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les facteurs rhumatoïdes constituent une population d'autoanticorps réagissant avec différents sites antigéniques situés sur le fragment Fc des immunoglobulines de classe G. Ces déterminants antigéniques peuvent être spécifiques des IgG humaines ou communs aux IgG de diverses espèces animales. Les facteurs rhumatoïdes peuvent appartenir à toutes les classes d'immunoglobulines, cependant les FR de classe IgM sont majoritaires.

Les facteurs rhumatoïdes sont essentiellement associés à des pathologies rhumatismales inflammatoires. Ils sont présents avec une fréquence élevée dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. La spécificité des FR pour la polyarthrite rhumatoïde est augmentée par la constatation d'une positivité associée pour les immunoglobulines G d'origine humaine et pour les immunoglobulines G de lapin.

Les méthodes de diagnostic communément utilisées sont les tests d'agglutination au latex qui identifient les FR de classe IgM dirigés contre les déterminants antigéniques humains et la réaction d'hémagglutination de Waaler-Rose qui identifie les FR de classe IgM dirigés contre les déterminants antigéniques du lapin.

Cependant les techniques immunoenzymatiques, plus sensibles et plus spécifiques, présentent l'avantage de pouvoir effectuer une détermination simultanée des deux types de spécificité.

En dehors des pathologies rhumatismales, les FR peuvent apparaître au cours de certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne ou virale ou au cours de pathologies inflammatoires. Leur prévalence est alors de 2 % environ. Leur taux est faible et leur réactivité est dirigée uniquement vers les IgG d'origine humaine. Dans la population normale la prévalence des FR est de 2 à 5 %.

PRINCIPE DU TEST

FIDIS™ Rheuma - RF (Theradiag) repose sur l'utilisation de microsphères de taille uniforme différemment colorées et d'un cytomètre en flux interfacé avec un système informatique de digitalisation et de traitement du signal. Une diode rouge du cytomètre en flux, en classant chaque catégorie de microsphères sur la base de sa fluorescence unique (du rouge à l'orange), permet l'identification du paramètre analysé. Parallèlement un laser excite la fluorescence d'un composé secondaire pour quantifier la réaction spécifique qui y est associée.

Chaque antigène nécessaire à la réalisation du test est couplé de façon covalente à une catégorie de microsphères colorées. Les différentes catégories sont ensuite mélangées pour constituer le réactif final, support des réactions immunologiques spécifiques avec les différents autoanticorps recherchés.

Le coffret **FIDIS™ Rheuma - RF** (Theradiag) permet de détecter les facteurs rhumatoïdes des classes IgM dirigés contre les déterminants Fc d'Immunoglobulines G, humaines ou animales.

Le test est réalisé dans une microplaque de filtration de 96 puits.

- Au cours d'une première étape, les échantillons dilués des patients à tester sont incubés en présence des microsphères sensibilisées par des **Immunoglobulines G, humaines ou animales**. Les anticorps présents dans le sérum des patients se fixent alors sur les antigènes immobilisés à la surface des microsphères.
- Une étape de lavage par filtration permet d'éliminer les éléments non fixés.
- Un anticorps secondaire conjugué à la phycoérythrine dirigé contre les immunoglobulines humaines **d'isotype IgM** permet de révéler les anticorps précédemment capturés.
- Une étape de lavage final stoppe la réaction et élimine les anticorps non liés.
- La réaction est alors mesurée par le cytomètre en flux qui identifie chaque type de microsphères et mesure la fluorescence moyenne des conjugués fixés.
- Un système de calibration permet, par interpolation, de définir la valeur de l'échantillon en unité internationale (UI/ml) sur chacune des spécificités antigéniques.

Le coffret **FIDIS™ Rheuma - RF** (Theradiag) peut être utilisé avec l'automate de dilution/répartition **CARIS™.**

ÉCHANTILLONS

- Utiliser du sérum.
- Eviter d'utiliser des sérums lipémiques ou hémolysés, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus d'une fois.
- Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2°C et +8°C pendant 5 jours maximum. Au-delà ils devront être congelés à - 20°C.
- Afin de limiter toute fixation non spécifique, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

COMPOSITION DU COFFRET

Plaque de 96 micropuits à membrane filtrante munie d'un couvercle. **MP**	1 plaque
Flacon **(A)** de microsphères colorées sensibilisées par les antigènes : *fragments Fc d'immunoglobulines humaines ou animales*. **MICROSPHERES** Lyophilisées (à reconstituer avec le tampon D)	Qsp 6 ml
Flacon **(B2)** tampon de dilution des échantillons (flacon blanc) Prêt à l'emploi **DIL** **SPE**	2 x 115ml
Flacon de calibrateur* titré en unité internationale pour les spécificités mesurées. **CAL** Prêt à l'emploi ***Les titres sont indiqués sur l'étiquette du flacon.***	1 x 1,5 ml
Flacon de contrôle positif donnant une réactivité standardisée et constituant un contrôle de réaction destiné à vérifier l'activité des réactifs et le bon fonctionnement de l'essai. **CONTROL** **+** A diluer ***Les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon.***	1 x 250 µl
Flacon de contrôle négatif **CONTROL** **-** A diluer	1 x 250µl
Flacon de conjugué anti-IgM humaine couplé à la phycoérythrine **CONJ** **IgM** Prêt à emploi	1 x 12 ml
Flacon **(C2)** de tampon de lavage (flacon noir) Prêt à emploi **BUF** **WASH**	1 x 100 ml
Flacon **(D)** de tampon de reconstitution des microsphères **BUF** **MICROSPHERES** Prêt à l'emploi	1 x 6ml

Les titres* du calibrateur sont indiqués sur l'étiquette du flacon et sont exprimés en unités internationales (UI/ml) standardisés par rapport à la référence internationale : 64/2 (1st British Standard for Rheumatoid Arthritis).

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Pipettes de précision capables de délivrer précisément de 5µl à 1000 µl.
- Pipette multicanaux ou distributeur répétitif capables de délivrer précisément de 40µl à 300µl ou 5µl à 2 ml.
- Agitateur
- Chronomètre
- Sonicateur
- Papier absorbant
- Pipettes sérologiques
- Films pour microplaques

STABILITE ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Tous les réactifs doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas congeler les réactifs.
- Ne pas utiliser un coffret dont les dates de péremption sont dépassées.
- Remettre immédiatement entre +2°C et +8°C, les réactifs non utilisés.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Les réactifs en solutions contiennent comme agent de conservation, de l'azide de sodium à une concentration <0.1% (w/v) ou du ProClin® 300 à 0.02% (w/v). Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. L'azide de sodium peut former des mélanges explosifs lors de son élimination dans les canalisations de cuivre ou de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.
- Ne pas utiliser les réactifs si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent.
- Le coffret **FIDIS™ Rheuma - RF** (Theradiag) a été élaboré dans le respect des Directives européennes 67/548/CEE et 1999/45/CE en ce qui concerne la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses.
- **FIDIS™ Rheuma - RF** (Theradiag) a été optimisé pour les conditions opératoires précisées dans cette notice. Le non-respect des dilutions, de la préparation des réactifs, du protocole ou la substitution d'un réactif par un autre produit peuvent affecter les performances finales du test.
- *Les contrôles et le calibrateur sont d'origine humaine. Pour chacun, les recherches d'anticorps anti-HIV 1 et 2, anti-HCV et d'antigènes de l'hépatite B se sont révélées négatives. S'agissant de produits potentiellement infectieux, il est toutefois nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.*

⚠ Le coffret FIDIS™ Rheuma - RF ne peut pas être utilisé en multi-batch avec les autres coffrets de la gamme FIDIS™.

PREPARATION DU TEST

Préparation de l'unité de filtration FIDIS™

☞ Vérifier les tuyaux reliant la pompe au support et le réglage du manomètre (molette totalement fermée).

Utilisation du système d'analyse FIDIS™ et du logiciel MLX-BOOSTER

☞ Se reporter au Manuel d'utilisation fourni avec **le système FIDIS™** pour effectuer les étapes de mise en route et de calcul. Pour toutes informations complémentaires et/ou résolution de problèmes, veuillez prendre contact auprès de Theradiag ou de votre distributeur.

1. Commencer la série comme indiquée dans le Manuel d'utilisation.
   N.B : L'appareil met 30 minutes pour chauffer après l'avoir allumé. Un nouveau préchauffage est nécessaire après 4 heures d'inactivité du système.
2. Les étapes de calibration et de contrôles sont décrites dans le Manuel d'utilisation. Ces 2 étapes devront être exécutées régulièrement 1 fois/mois et à chaque nouveau lot de « Sheath fluid » afin d'assurer une performance optimale de l'appareil. L'étape de

calibration doit également être effectuée si la température indiquée sur l'écran de la série du lot est en dehors de celle paramétrée.

3. Programmer un lot ou une série de lots multiples sur FIDIS™ comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.
4. Placer la microplaque dans le support de plaques du système FIDIS™ comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.
5. Effectuer l'analyse des résultats comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.
6. A la fin de la dernière utilisation journalière de l'appareil, exécuter les opérations de lavage et de désinfection avant d'arrêter le système d'analyse conformément aux instructions d'arrêt décrites dans le Manuel d'utilisation.

Préparation des réactifs

☞ Ramener l'ensemble des réactifs à **température ambiante** (+18°C/+25°C) avant de les préparer extemporanément.

1. Préparation des échantillons et des contrôles

- Diluer les échantillons et les contrôles au **1/201** dans le tampon de dilution **(B2).**

  *Exemple : 10µl d'échantillon dans 2000µl de tampon de dilution **(B2).***

- **Agiter vigoureusement au vortex.**

2. Définition de la configuration du test

Utiliser la feuille de travail contenue dans le coffret pour noter la localisation des échantillons.

a. Prévoir systématiquement :

- 1 puits « blanc réactif »
- 1 puits pour le contrôle négatif
- 1 puits pour le contrôle positif
- 2 puits « calibrateur »

b. Détermination du nombre exact de puits nécessaires et de leur attribution.

Les schémas qui suivent donnent 2 exemples de configuration selon le nombre de puits nécessaires et la disponibilité en puits vierges. Le sens du dépôt doit s'effectuer systématiquement par colonne sans intercaler de puits vides.

Une même plaque peut être utilisée au cours de différents essais si les puits non utilisés sont protégés par des films pour microplaque. Un même puits ne peut être réutilisé plusieurs fois.

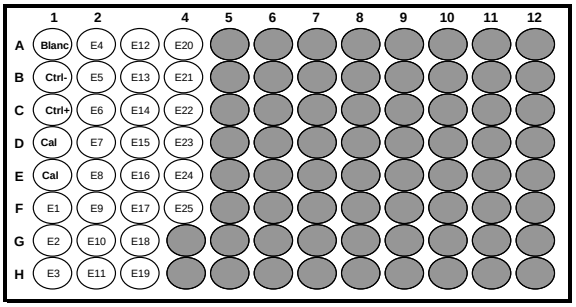
Afin d'éviter toute erreur dans ce sens, il est conseillé d'identifier les puits déjà usagés (voir exemple 2 ci-après).

c. Programmation du protocole d'analyses au niveau du FIDIS™

☞ Se reporter au manuel d'utilisation FIDIS™ « Programmation d'un batch».

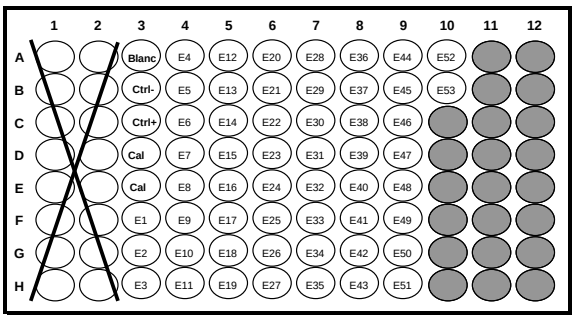
Exemple 1 :

- la plaque est totalement vierge : l'attribution des puits débute en A1.



Exemple 2 :

- 16 puits ont déjà été utilisés : l'attribution des puits débute en A3.



MODE OPERATOIRE

1. Distribution des microsphères

- Protéger les puits non utilisés avec des films plastiques (si nécessaire).
- Déposer 50µl de microspheres dans chaque puits, **après avoir préalablement agité le flacon vigoureusement au vortex pendant 20s.**

REMARQUE :

- **Dans le cadre de l'utilisation de l'automate CARIS™, une sonication des microsphères de 5 minutes est préconisée.**
- **Dans le cadre de l'utilisation d'un automate de dilution/répartition, les étapes 1 et 2 doivent être inversées :**
  ⇨ distribuer le sérum dilué puis les microsphères

2. Incubation des échantillons

- Déposer 100µl de tampon de dilution **(B2)** pour le blanc réactif.
- Déposer 100µl de contrôles dilués, de calibrateur prêt à l'emploi et d'échantillons dilués.
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante sans agitation en recouvrant la plaque et en évitant de la laisser sous la lumière directe.

3. Lavage 1

Laver la plaque en utilisant l'unité de filtration par 2 cycles successifs en tampon de lavage **(C2)** :

a. Retirer le couvercle de la microplaque et la positionner sur l'unité de filtration.
(vérifier que le robinet « casse vide » est en position fermée).

b. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».

c. Distribuer 300µl de tampon de lavage **(C2)**.

d. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».

e. Distribuer 300µl de tampon de lavage **(C2)**.

f. Déclencher la pompe. Après aspiration totale du liquide, compter 5 secondes supplémentaires, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».

g. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base 10 fois sur du papier absorbant.

h. Repositionner la plaque sur le laveur et filtrer à nouveau 5 secondes. Arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».

i. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base sur un papier absorbant.

j. Placer ensuite la microplaque sur une surface totalement sèche avant de distribuer le conjugué.

4. Incubation du conjugué

- Déposer 100µl de conjugué
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante sans agitation, en recouvrant la plaque et en évitant de la placer sous la lumière directe. Le temps d'incubation débute après que le conjugué ait été ajouté à tous les puits. Si ce temps n'est pas respecté, les résultats pourront être erronés.

Remarque : le conjugué est sensible à la lumière
⇒ Refermer le flacon après utilisation.

5. Lavage 2

Laver la plaque en utilisant l'unité de filtration par 1 cycle en tampon de dilution **(B2)** :

Utiliser de préférence deux réservoirs à réactifs distincts pour les lavages 1 et 2.
Ou bien nettoyer et sécher correctement le réservoir entre les deux lavages afin de ne pas mélanger les deux tampons B2 et C2.

a. Retirer le couvercle de la microplaque et la positionner sur l'unité de filtration. (vérifier que le robinet « casse vide » est en position fermée).

b. Déclencher la pompe.
Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide par ouverture du robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».

c. Distribuer 100µl de tampon de dilution **(B2)**.

d. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».

e. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base sur un papier absorbant.

f. Distribuer 100µl de tampon de dilution **(B2)** et procéder à l'analyse de la microplaque.
En cas de lecture différée, la plaque devra être analysée **dans l'heure qui suit l'ajout de la solution** (B2). Durant cette période, la plaque doit être conservée à température ambiante et protégée de la lumière directe.

6. Analyse

☞ L'effectuer conformément au manuel d'utilisation **FIDIS™** et **MLX BOOSTER™.**

CRITERES DE VALIDATION DES RESULTATS

Le calibrateur, les contrôles positif et négatif doivent être testés dans chaque série d'essai pour s'assurer que tous les réactifs et procédures ont été exécutés correctement.

Afin de valider les résultats, tous les critères énumérés ci-dessous doivent être rencontrés.

En cas de non-conformité d'un de ces critères, le test devra être considéré comme non valide et l'analyse devra être refaite.

a. La valeur du contrôle positif doit être comprise dans les limites de celles indiquées sur les étiquettes des flacons correspondants.
b. La valeur du contrôle négatif doit être inférieure à 25 UI/ml.

La solution de microspheres contient des billes témoins permettant de vérifier la présence de sérum dans les puits, ainsi que le bon déroulement du test. Un puits présentant un signal-réponse non conforme sera invalidé par le logiciel MLX BOOSTER™.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Unités Internationales (UI/ml) pour les 2 spécificités	< 25 UI/ml	25 – 30 UI/ml	> 30 UI/ml
Interprétation	Négatif	Limite(*)	Positif

(*) Les résultats limites doivent être contrôlés sur un second prélèvement et interprétés en fonction d'examens complémentaires et du contexte clinique.

Chaque laboratoire doit établir et conserver ses propres valeurs de plage (normale) de référence, en fonction de la population de patients et d'autres facteurs locaux.

CALCUL DES RESULTATS

☞ Les résultats sont automatiquement calculés par le logiciel MLX-BOOSTER™ et peuvent être imprimés pour chaque analyse.

LIMITES

Les sérums hémolysés, lipémiques, ictériques, présentant des taux élevés en IgG monoclonal, des complexes immuns ou des facteurs rhumatoïdes peuvent entraîner des résultats faussement positifs.

Les sérums de patients immunodéprimés donneront un résultat non valide.

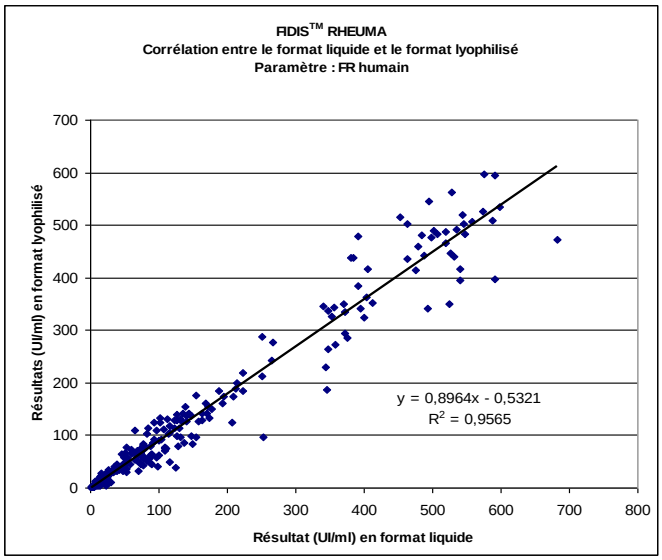
CONTROLE DE QUALITE

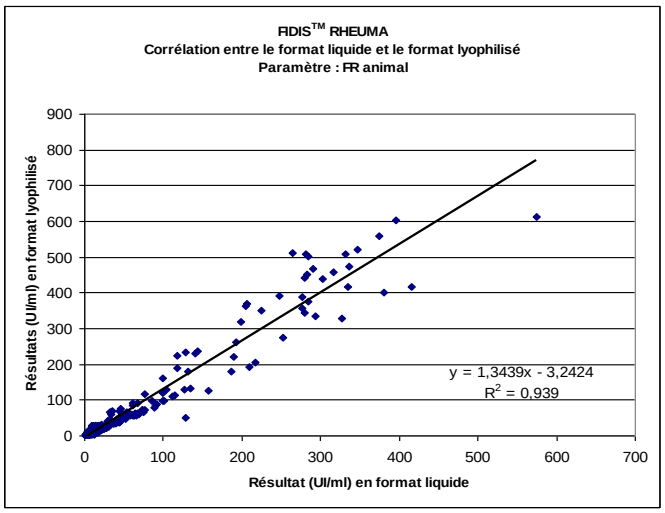
Il est conseillé d'utiliser des contrôles internes ou externes pour les différentes spécificités. Le contrôle multiparamétrique Immuno-Trol III (Theradiag, réf. : HM050) renferme des anticorps humains dirigés contre les Facteurs Rhumatoïdes (RF) d'isotype IgM de spécificité humaine et animale. Il est à tester de façon identique à celle des échantillons.

CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

CORRELATION

Les performances du coffret **FIDIS™ Rheuma** (Theradiag) (sous sa nouvelle forme lyophilisée) ont été comparées à celles de l'ancien coffret **FIDIS™ Rheuma** (Theradiag) (format liquide) sur une population de 265 échantillons. L'analyse de la courbe de régression linéaire montre que les deux produits sont équivalents.





FIDELITE DU TEST (FORMAT LYOPHILISE)

	Intra-essai (10 tests dans le même essai)		Inter-essais (5 tests dans 5 essais différents)	
Spécificité antigénique	**Valeur moyenne (UI/ml)**	**CV (%)**	**Valeur moyenne (UI/ml)**	**CV (%)**
FRh	65	0,8	92	7,1
FRh	103	2,8	201	9,9
FRh	407	2,0	492	3,7
FRa	82	3,6	127	15,0
FRa	143	3,1	154	11,0
FRa	443	1,4	504	5,0

SENSIBILITE, SPECIFICITE, CONCORDANCE PAR RAPPORT AUX AUTRES METHODES

FIDIS™ Rheuma – RF (Theradiag) a été comparé :

⇒ au coffret FR-LISA (Theradiag) basé sur une méthode ELISA pour la détection des facteurs rhumatoïdes d'origine humaine et animale.

Méthodes de confirmation en cas de résultats discordants :

⇒ ELISA (CLB) pour la spécificité humaine et

⇒ POLYARTITRE (Fumouze) basée sur une méthode d'hémagglutination pour la spécificité animale.

L'étude a porté sur 223 échantillons :

⇒ 81 échantillons associés à la présence de pathologies rhumatismales

⇒ 64 échantillons provenant d'individus sains

⇒ 78 échantillons présentant des marqueurs biologiques susceptibles de provoquer des interférences (cryoglobulinémie, hypergammaglobulinémie, immunoglobulines monoclonales IgG et IgM, complément, complexes immuns).

Résultats

Spécificité humaine		**ELISA** Positifs	**ELISA** Négatifs
FIDIS™	Positifs	95	1
	Négatifs	0	127

Spécificité animale		**ELISA** Positifs	**ELISA** Négatifs
FIDIS™	Positifs	53	1
	Négatifs	1	168

Performances sur la population étudiée

Spécificité antigénique	**Sensibilité relative (%)**	**Spécificité relative (%)**	**Concordance (%)**
Spécificité humaine	100	99.2	99.6
Spécificité animale	98.2	99.4	99.1

Analyse des résultats discordants (3/223)

Spécificité antigénique	**Résultat FIDIS™**	**ELISA** Theradiag	**ELISA CLB ou Hémagl.**	**Spécificités associées**
FRh	positif limite	limite	négatif	donneur de sang
FRa	limite	positif	faiblement positif	humaine
FRa	positif limite	négatif	négatif	humaine

Les 3 résultats concernent des échantillons en limite de positivité, ce qui tend à engendrer des discordances qui restent négligeables.

Mode de détermination du seuil de positivité

Estimé à partir des 142 échantillons issus des populations « individus sains » et « interférences biologiques » et par rapport au standard 64/2.

Le seuil de positivité (30UI/ml) correspond au 99.5ème percentile de la distribution des valeurs pour les 2 spécificités.

Le seuil de négativité (25UI/ml) correspond au 96.5ème percentile pour les 2 spécificités.

Entre ces 2 seuils, les résultats sont considérés limites.

BIBLIOGRAPHIE

WILLIAMS DG.
Rheumatoid arthritis : autoimmunity in rheumatoid arthritis.
In : Klippel JH, Dieppe PA, eds. Rheumatology, 1st edition. St louis 1994 ;91 :9-11.

SHMERLING RH, DELBANCO TL.
The rheumatoid factor : an analysis of clinical utility.
Am J Med 1991 ;91 :528-534.

BORRETZEN M et al.
Rheumatoid Factors.
In : Autoantibodies. JB Peter and Y. Schoenfeld Eds. Elsevier Sciences B.V. 1996 ;706-715.

ARNETT FC et al.
The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 1988 ;31 :315-324.

MOORE TT et al.
Rheumatoid Factors.
Clin Biochem 1993 ;26 :75-84.

CORPER AL et al.
Structure of human IgM rheumatoid factor Fab bound to its autoantigen IgG Fc reveals a novel topology of antibody-antigen interaction.
Nat Struct Biol. 1997 May;4(5):374-81.

SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

	QUANTITE A DISTRIBUER	*REACTIFS*	*CONDITIONS D'INCUBATIONS*
Déposer 50µl de microsphères dans chaque puits			
Incubation des échantillons	100µl 100µl 100µl 100µl 100µl	Tampon de dilution **(B2)** : blanc réactif Contrôle négatif dilué *en tampon de dilution* ***(B2)*** Contrôle positif dilué *en tampon de dilution* ***(B2)*** Calibrateur prêt à l'emploi (en double) Echantillons dilués *en tampon de dilution* ***(B2)***	30 min. Température ambiante
Lavage 1	Laver 2 fois au tampon de lavage **(C2)** (300µl/puits)		
Incubation du conjugué	100µl	Conjugué anti-IgM Prêt à l'emploi	30 min. Température ambiante
Lavage 2	Laver 1 fois avec du tampon de dilution **(B2)** (100µl/puits)		
Lecture	***Ajouter 100µl/puits de tampon de dilution (B2)*** ***et analyser par insertion de la plaque dans le cytomètre de flux*** *En cas de lecture différée, la plaque devra être analysée* ***dans l'heure qui suit l'ajout de la solution*** *(B2). Durant cette période, la plaque doit être conservée à température ambiante et protégée de la lumière directe.*		

LEGENDES DES SYMBOLES

	Risque Biologique	+8°C / +2°C	Conserver à	REF	Numéro de catalogue
	Lire le manuel d'utilisation	IVD	Pour le diagnostic in vitro uniquement	LOT	Numéro de lot
Σ	Nombre de tests		A utiliser avant	CE	Déclaration de conformité CE
MP	Microplaque	CONTROL -	Contrôle négatif	MICROSPHERES	Microspheres
DIL SPE	Diluant échantillon	CONTROL +	Contrôle positif	CONJ IgM	Conjugué IgM
CAL	Calibrateur	BUF WASH	Tampon de lavage	BUF MICROSPHERES	Tampon de reconstitution des microsphères
	Test FIDIS	CONT NaN_3	Contient de l'azide de sodium	RCNS	A reconstituer
	Fabricant			CE	

4-6 bld de Beaubourg,
CS 90138 CROISSY BEAUBOURG
77435 MARNE LA VALLEE CX2
France

Tél : 01 64 62 10 12
Fax : 01 64 62 09 66

E-mail : support@theradiag.com
Internet : www.theradiag.com

English

FIDIS™ Rheuma - RF

REF MX 103 96

INTENDED USE

The **FIDIS™ Rheuma - RF** (Theradiag) is a quantitative homogeneous fluorescent-based microparticles immunoassay using flow cytometry readings. It is designed for the simultaneous detection of IgM class rheumatoid factors directed against Fc determinants from human or animal G Immunoglobulins.

SUMMARY AND EXPLANATION

Rheumatoid factors (RF) form a population of autoantibodies reacting with the various antigenic sites located on the Fc fragment of the IgG class immunoglobulins. These antigen determinants may be specific to human IgG or common to the IgG of various animal species. Rheumatoid factors may belong to any immunoglobulin class, but the IgM class is dominant.

Rheumatoid factors are essentially associated to inflammatory rheumatic pathologies. The frequency of their presence is increased in the serum of patients suffering from rheumatoid polyarthritis. RF specificity is extended due to the fact that there is an associated positivity between human IgG and rabbit IgG.

Routinely, the diagnostic methods used are: latex agglutination test to identify IgM class RF directed against human antigen determinants and the Waaler-Rose haemagglutination test to identify the IgM class RF directed against rabbit antigen determinants.

However, EIA methods offer increased sensitivity and specificity as well as the advantage of a simultaneous determination of both specificities.

Apart from rheumatic pathologies, RF might appear in specific bacterial and viral infectious diseases or in inflammatory pathologies.

The prevalence is, then, ca. 2 %, the titer is low and the reactivity directed against human IgG solely. In a normal population, the RF prevalence is of 2 to 5%.

ASSAY PRINCIPLE

FIDIS™ Rheuma - RF (Theradiag) kits are based on the use of distinct uniform size color-coded microspheres and a benchtop flow cytometer interfaced to digital signal processing hardware and software. A red diode laser beam in the flow cytometer classifies each set of microspheres on the basis of its unique fluorescence intensity (red to orange) thus identifying which analyte is being tested. At the same time, a green laser beam illuminates the external second molecule fluorescence to quantify the reaction related to the specific analyte.

Each antigen required for the assay is covalently coupled to an individual set of microspheres through its surface functional groups. The different antigen coupled microspheres are mixed together, constituting the final microsphere reagent.

FIDIS™ Rheuma – RF (Theradiag) kits allow the detection of IgM class rheumatoid factors directed against **Fc determinants from human or animal G Immunoglobulins**.

The test is performed in a 96 well microplate with a filtering membrane at the bottom of the wells.

- In the first step, the sample is distributed in each well containing the microspheres mixture. If this sample contains one or more of the suspected antibodies, this(ese) antibody(ies) binds to the corresponding antigen(s) on the various sets of microspheres.
- After incubation, a wash step using a filtration process removes the unbound antibodies.
- A phycoerythrin labeled **anti-human IgM** conjugate is then added that binds to the previously bound antibodies.
- A final wash step allows to stop the reaction.
- The reaction is then directly measured by the flow cytometer, which differentiates each set of microspheres according to its fluorescence colour while simultaneously measuring the average fluorescence emitted by the conjugate.
- A calibration system allows the determination of the titer (IU/mL) of each sample by interpolation for each antigenic specificity.

The **FIDIS™ Rheuma - RF** (Theradiag) could be used with **CARIS™** system (diluting and dispensing device).

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

- The test is performed on serum.
- Lipemic sera should be avoided, as well as samples which have been frozen and defrosted more than once.
- If the test is not run immediately, the samples should be stored at +2°C/+8°C for a maximum of 5 days, for longer storage, frozen undiluted samples at -20°C.
- To avoid non-specific binding, it is recommended to centrifuge and filter the cloudy samples or samples frozen for more than 6 months.

REAGENTS SUPPLIED

96 wells microplate with filtering membrane and lid. **MP**	1 plate
Vial **(A)** of color-coded microsphere set sensitized by the Fc fragment of Human or Animal Immunoglobulins antigen(s). Lyophilized (to be reconstituted with the buffer named D) **MICROSPHERES**	Sq 6 mL
Vial **(B2)** of sample dilution buffer (white vial). Ready to use **DIL** **SPE**	2 x 115mL
Vial of calibrator* tittered in international unit for the specificities to be measured. **CAL** Ready to use ***Each titer is printed on the vial label***	1 x 1,5 mL
Vial of positive control concentrated. This control has a standard reactivity, which provides evidence of the proper reagents activity and proper assay performance. To be diluted **CONTROL** **+** ***Expected values are printed on the vial label.***	1 x 250 µL
Vial of negative control concentrate To be diluted **CONTROL** **-**	1 x 250 µL
Vial of anti-human IgM coupled to phycoerythrin Ready to use CONJ IgM	1 x 12 mL
Vial **(C2)** of washing buffer (black vial) Ready to use BUF WASH	1 x 100 mL
Vial **(D)** of reconstitution buffer for the microsphere set **BUF** **MICROSPHERES** Ready to use	1 x 6mL

Calibrator* titers are printed on the vial label and are expressed in international units per ml (IU/ml) and standardized against the International Reference: 64/2 (1st British Standard for Rheumatoid Arthritis)

ADDITIONAL MATERIAL – NOT SUPPLIED

- Precision pipettes capable of accurately delivering 5µL to 1000µL
- Multichannel Pipettes or dispensers capable of accurately delivering 40µL to 300µL or 5µL to 2 mL
- Vortex mixer
- Laboratory timer to monitor incubation steps
- Ultrasonic bath
- Absorbent towel
- Serological pipettes
- Microplate sealing films

STABILITY AND STORAGE

- Store reagents in their original packaging at +2°C to +8°C.
- Do not freeze reagents.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- After use, store all components immediately back at +2°C to +8°C.

CAUTION

- Reagents in solution contain less of 0.1% (w/v) sodium azide and 0.02% (w/v) of Proclin® 300. Do not eat and avoid contact with skin and eyes. Azide can form explosive mixtures in copper or lead piping. Rinse thoroughly after flushing.
- Avoid to use reagents if signs of contamination or other visible changes occur.
- The **FIDIS™ Rheuma - RF** (Theradiag) has been developed according to CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC regarding classification, packaging and labelling of dangerous preparations.
- The **FIDIS™ Rheuma - RF** (Theradiag) has been optimized for use as described in this procedure. Do not substitute other manufacturer reagents. Dilution or alteration of these reagents may also alter the performance of the test. Follow thoroughly the test procedure to insure optimal performance.
- *Calibrators and controls are from human origin. The human sera used in the preparation of these products were tested and found non-reactive for antibodies to HIV-1, HIV-2, anti-HCV and Hepatitis B antigen. Because no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, handle as if capable of transmitting infectious diseases.*

⚠ FIDIS™ Rheuma - RF cannot be used in multi-batch with the other FIDIS™ kits.

TEST SET-UP

FIDIS™ Washer

☞ Check the tubing connecting the pump to the stand and the manometer setting (wheel completely closed).

Using FIDIS™ Analyzer and MLX-BOOSTER Software

☞ See the User's Manual provided with the **FIDIS™ Instrument** for detailed instructions on running the equipment and for calculation. For additional information and/or trouble shooting problems, please contact Theradiag subsidiaries or distributors.

1. Start the run as described in the User's Manual. NOTE: The FIDIS™ takes 30 minutes to warm up after being turned on. A new warm up is necessary after 4 hours of system inactivity.
2. Calibration and controls are described in the User's Manual. Calibration and controls should be routinely performed once per month and each time a new lot of Sheath fluid reagent is used in order to insure optimal instrument performance. Calibration should also be performed when the temperature is out of

the determined range shown on the run batch screen.

3. Programming a batch or a multibatch of test protocol on the FIDIS™ as described in the User's Manual.

4. Load the microplate into the plate holder of the FIDIS™ as described in the User's Manual.

5. Analyze the results according the User's Manual.

6. When finished for the day, perform the sanitizing and soak operations, prior to turning the Analyzer off according to the shutting down procedure described in the User's Manual.

Reagents Preparation

☞ Remove the individual components from storage, allow them to warm up to **room temperature** (+18°C to +25°C), and mix them well.

1. Preparation of samples and controls.

- Dilute the samples and controls at **1:201** in dilution buffer **(B2)**.

  *Ex.: 10µL sample in 2000µL dilution buffer **(B2)**.*

- **Vortex vigorously.**

2. Assay configuration

Use the work-sheet included in the kit to identify the location of the samples.

a. *When setting up the test, systematically take into account the following well requirements:* ⇨ See examples below

- 1 "reagent-blank" well
- 1 well for negative control
- 1 well for positive control
- 2 "calibrator" wells

b. Calculation of the correct number of wells necessary and their location.

In the following examples, 2 different configurations are described, according to the number of wells needed, and the availability of unused wells. The sample dispensing must be systematically carried out in a column. Do not leave empty wells.

The same microplate can be used for more than one serie of tests if unused wells are protected by microplate sealing film. Any single well can only be used once.

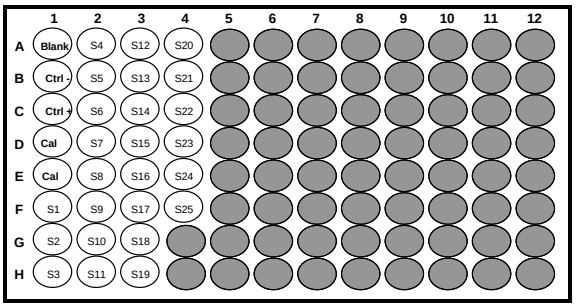
To avoid any error in using a well more than once, identify the used wells with a marker (see example 2 below).

c. Programming of the test protocol on the FIDIS™

☞ Refer to the FIDIS™ user's manual: "Creating a batch".

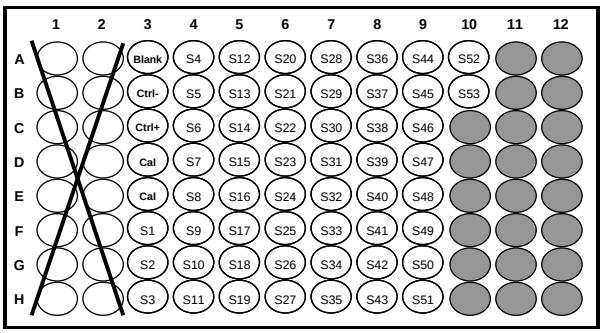
Example 1:

- *The microplate is totally blank (no well has yet been used): Use A1 as the 1st well.*



Example 2:

- *16 wells have already been used: Use A3 as the 1st well.*



ASSAY PROCEDURE

1. Microspheres dispensing

- Before to start the assay and if it is necessary, protect the unused wells with a microplate sealing film.
- **Vortex the microspheres reagent vigorously for 20s** and dispense 50µL in each well to be used.

PLEASE NOTE:

- **If CARIS™ is used, the microspheres should be sonicated for 5 minutes.**
- **If a dispensing/diluting device is used (like CARIS™), the procedure steps 1 and 2 should be reversed: ⇨ dispense diluted sera in first and then, dispense microspheres.**

2. Addition and Incubation of the samples

- Dispense 100µL of sample dilution buffer **(B2)** for reagent blank.
- Dispense 100µL of prediluted controls, of ready to use calibrator and of prediluted samples.
- Cover the plate and incubate 30 minutes at room temperature, away from direct sunlight and without shaking.

3. Wash step 1

Wash the plate 2 times with washing buffer **(C2)** using filtration unit:

a. Remove the microplate lid (verify if the vacuum break valve is closed) and place it on the washer.

b. Start the pump. Stop it when the whole incubation liquid has been removed in totality and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.

c. Dispense 300µL of washing buffer **(C2)** in all the used wells.

d. Start the pump. Stop it when the whole buffer has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.

e. Dispense 300µL of washing buffer **(C2)** in all the used wells.

f. Start the pump. Stop it after 5 additional seconds when all the buffer has been removed and open the vacuum break valve.
Close the vacuum break valve.

g. Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by tapping vigorously the plate 10 times on an absorbent towel.

h. Place again the microplate on the washer and start the pump for 5 seconds. Stop it and quickly open the vacuum break valve.

i. Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by blotting vigorously the plate on an absorbent towel.

j. Place the plate on a totally dry surface before starting the conjugate incubation.

4. Incubation of the conjugate

- Dispense 100µL of ready to use conjugate in each well used.
- Cover the plate and incubate 30 minutes at room temperature away from direct sunlight and without shaking. The incubation time starts after the conjugate has been added to all wells. If this timing is not followed, the results might be erroneous.

Note : the conjugate is photosensitive.
⇒ After using, close the vial carefully.

5. Wash step 2

Wash the plate using the filtration unit on 1 cycle with dilution buffer **(B2)**.

Use two different reagent reservoirs for the 2 washing steps.
Either clean and dry correctly the reservoir between both wash steps (avoid to mix both B2 and C2 buffers).

a. Remove the microplate lid (verify that the vacuum break valve is closed) and place it on the washer.

b. Start the pump. Stop it when the whole incubation liquid has been removed and open the vacuum break valve.
Close the vacuum break valve.

c. Dispense 100µL of dilution buffer **(B2)** in all the used wells.

d. Start the pump. Stop it when the whole buffer has been removed and open the vacuum break valve.
Close the vacuum break valve.

e. Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by blotting the plate on an absorbent towel.

f. Dispense 100µL of dilution buffer **(B2)** in all the used wells. Place the plate on a totally dry surface at room temperature.

The reading must be doing in the hour following adding the solution (B2). During this time, keep the plate at room temperature away from direct sunlight.

6. Reading of the test

☞ Follow the **MLX-BOOSTER™** and **FIDIS™** user's manual: Processing batches.

VALIDATION CRITERIA OF THE RESULTS

Calibrator, negative and positive controls have to be run with every batch of samples to ensure that all reagents and procedures performed properly.

In order to validate the results, all the criteria listed below must be met. Otherwise, the test is invalid and must be repeated.

a. The positive controls should show a value within the limits printed on the corresponding vial labels.

b. The negative controls should be less than 25 IU/mL.

The microsphere set contains Internal standard beads allowing to verify the presence of serum in wells, as well as the good respect of the test procedure. Wells presenting a not corresponding fluorescent signal will be no valid with MLX BOOSTER™ software.

INTERPRETATION OF RESULTS

International Units (IU/ml) for the 2 specificities	< 25 IU/ml	25 – 30 IU/ml	> 30 IU/ml
Interpretation	Negative	Borderline(*)	Positive

(*) Borderline results should be repeated on a second sample and the interpretation of the results should be treated in the frame of additional testing and taking into account the clinical status of the patient.

Each laboratory should establish and maintain its own references (normal) range values, based on the patient population and other local factors.

CALCUL OF RESULTS

☞ The results are automatically calculated by MLX-BOOSTER™ software and can be printed for each assay.

LIMITATION

Hemolytic, lipemic, icteric samples or samples with abnormal concentration of IgG and/or complement levels or samples with rheumatoid factor may confound the results of this assay.

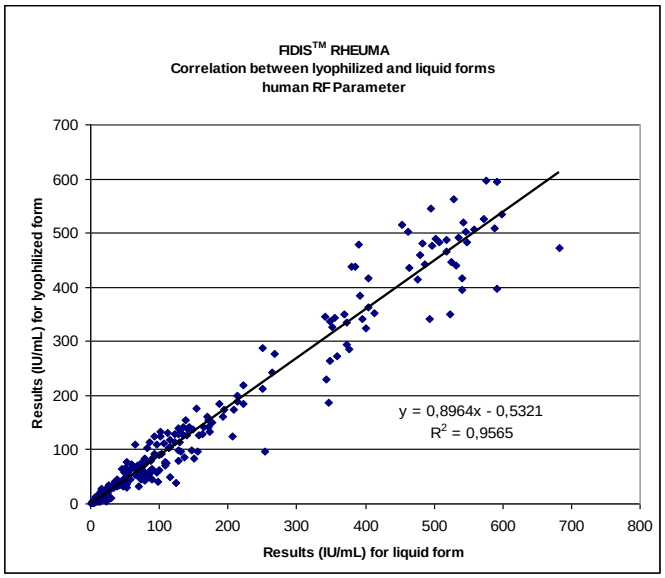
The serums from Immunodeficient patients will give a no valid result.

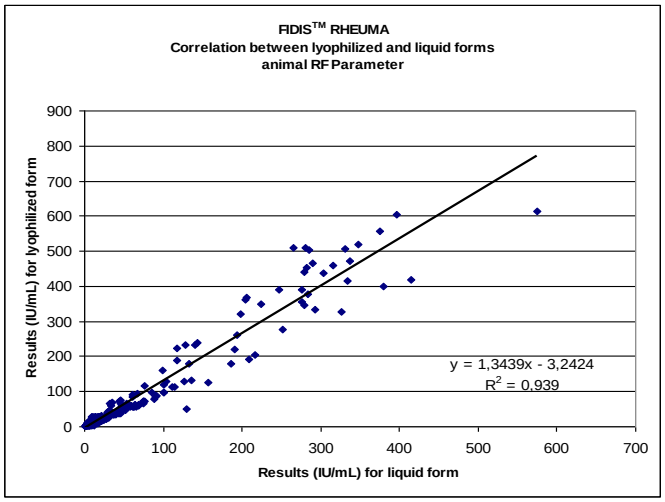
QUALITY CONTROL

It is recommended to use internally or externally sourced control material for the different specificities. (Theradiag, Cat n°: HM050) contains human and animal antibodies directed against human specific IgM isotype Rheumatoid Factor (RF). This material is to be assayed in the same manner as the unknown samples.

CORRELATION

The performances of **FIDIS™ Rheuma-RF** (Theradiag), lyophilized form were assessed on a population of 265 samples and compared to the performances of **FIDIS™ Rheuma-RF** (Theradiag), liquid form. A linear regression analysis of the two products showed that both are equivalent.





REPRODUCIBILITY / PRECISION (LYOPHILIZED FORM)

	Within-run (10 tests in the same run)		Between-run (5 tests in 5 different runs)	
Antigenic specificity	**Mean value (IU/mL)**	**CV (%)**	**Mean value (IU/mL)**	**CV (%)**
FRh	65	0.8	92	7.1
FRh	103	2.8	201	9.9
FRh	407	2.0	492	3.7
FRa	82	3.6	127	15.0
FRa	143	3.1	154	11.0
FRa	443	1.4	504	5.0

INDICATION OF THE DIAGNOSTIC VALUE IN COMPARISON WITH OTHER METHODS

FIDIS™ Rheuma - RF (Theradiag) has been compared to:

⇒ FR-LISA kit (Theradiag) based on ELISA method for the detection of rheumatoid factors from human and animal origin.

Confirmation methods for discrepant results:

⇒ ELISA (CLB) for human specificity and,

⇒ POLYARTITRE (Fumouze) based on haemagglutination method for animal specificity.

The study was performed on:

⇒ 81 samples related to rheumatoid diseases

⇒ 64 samples from blood donors

⇒ 78 samples selected for their potential biological interferences (cryoglobulinemia, hypergammaglobulinemia, IgG and IgM monoclonal immunoglobulins, complement, immune complexes).

Results

Human specificity		**ELISA**	
		Positive	Negative
FIDIS™	Positive	95	1
	Negative	0	127

Animal specificity		**ELISA**	
		Positive	Negative
FIDIS™	Positive	53	1
	Negative	1	168

Performances for the selected population

Antigen	**Relative sensitivity (%)**	**Relative specificity (%)**	**Relative accuracy (%)**
Human specificity	100	99.2	99.6
Animal specificity	98.2	99.4	99.1

Discrepant results analysis (3/223)

Antigenic specificity	**FIDIS™ result**	**ELISA** Theradiag	**ELISA CLB or Hémagl**	**Associated specificities**
FRh	positive (limit)	borderline	negative	Blood donor
FRa	borderline	positive	weakly positive	human
FRa	positive (limit)	negative	negative	human

The 3 results concern samples in limit of positivity, which can lead to no significant discrepancies.

Method for determining threshold values

Calculated on the 142 samples from « blood donors » and « biological interferences » populations and according standard 64/2.

The positive threshold (30IU/ml) corresponds to the 99.5th percentile of the values distribution for the 2 specificities.

The negative threshold (25IU/ml) corresponds to the 96.5th percentile for the two specificities.

Between these thresholds, results are considered borderline.

BIBLIOGRAPHY

WILLIAMS DG.
Rheumatoid arthritis : autoimmunity in rheumatoid arthritis.
In : Klippel JH, Dieppe PA, eds. Rheumatology, 1st edition. St louis 1994 ;91 :9-11.

SHMERLING RH, DELBANCO TL.
The rheumatoid factor : an analysis of clinical utility.
Am J Med 1991 ;91 :528-534.

BORRETZEN M et al.
Rheumatoid Factors.
In : Autoantibodies. JB Peter and Y. Schoenfeld Eds. Elsevier Sciences B.V. 1996 ;706-715.

ARNETT FC et al.
The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 1988 ;31 :315-324.

MOORE TT et al.
Rheumatoid Factors.
Clin Biochem 1993 ;26 :75-84.

CORPER AL et al.
Structure of human IgM rheumatoid factor Fab bound to its autoantigen IgG Fc reveals a novel topology of antibody-antigen interaction.
Nat Struct Biol. 1997 May;4(5):374-81.

SUMMARY OF THE TEST PROCEDURE

	VOLUME TO BE DISTRIBUTED	*REAGENTS*	*INCUBATION CONDITIONS*
Dispense 50µL of microspheres reagent in each well to be used			
Incubation of the samples	100µL 100µL 100µL 100µL 100µL	Dilution buffer **(B2)**: reagent blank Diluted negative control *in dilution buffer* **(B2)** Diluted positive control *in dilution buffer* **(B2)** Ready-to-use Calibrator (in duplicate) Diluted samples *in dilution buffer* **(B2)**	30 min. Room temperature
Washing 1	Wash twice in washing buffer **(C2)** (300µL/well)		
Incubation of the conjugate	100µL	Ready to use Anti-IgM conjugate	30 min Room temperature
Washing 2	Wash 1 time in Dilution buffer **(B2)** (100µL/well)		
Reading	***Add 100µL/well of Dilution buffer (B2) and proceed immediately with the reading in FIDIS™ Instrument*** ***The reading must be doing in the hour following adding the solution (B2)****. During this time, keep the plate at room temperature away from direct sunlight*		

SYMBOLS USED

	Biological risk	+8°C / +2°C	Temperature limitation	REF	Catalog Number
	Read instructions for use	IVD	In Vitro Diagnostic Use	LOT	Lot Number
Σ	Number of tests		Use by	CE	EC Declaration of Conformity
MP	Microplate	CONTROL -	Negative control	MICROSPHERES	Microspheres
DIL SPE	Specimen diluent	CONTROL +	Positive control	CONJ IgM	IgM Conjugate
CAL	Calibrator	BUF WASH	Wash Buffer	BUF MICROSPHERES	Microsphere reconstitution buffer
	FIDIS test	CONT NaN_3	Contains sodium azide	RCNS	Reconstitute with
	Manufacturer				

Theradiag

IVD

CE

4-6 bld de Beaubourg,
CS 90138 CROISSY BEAUBOURG
77435 MARNE LA VALLEE CX2
France

Tel : +33 (0)1 64 62 10 12
Fax : +33 (0)1 64 62 09 66

E-mail : support@theradiag.com
Internet : www.theradiag.com